

Rec'd PCT/PTO 15 APR 2005

PCT/JP2004/002780

04.3.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

10/531463

REC'D 22 APR 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 3月 7日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-061379
[ST. 10/C]: [JP2003-061379]

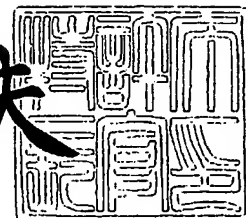
出 願 人
Applicant(s): 株式会社アウレオ

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3028812

【書類名】 特許願

【整理番号】 MP-1611

【提出日】 平成15年 3月 7日

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金台2丁目7番地7号 株式会社アウレオ
内

【氏名】 守屋 直幸

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金台2丁目7番地7号 株式会社アウレオ
内

【氏名】 守屋 ▲祐▼生子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金台2丁目7番地7号 株式会社アウレオ
内

【氏名】 鈴木 健司

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都港区白金台2丁目7番地7号

【氏名又は名称】 株式会社アウレオ

【代理人】

【識別番号】 100086689

【弁理士】

【氏名又は名称】 松井 茂

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 002071

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 便秘改善剤及びそれを含有する飲食品

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物と、乳酸菌菌体とを有効成分として含有することを特徴とする便秘改善剤。

【請求項 2】 前記アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌は、アウレオバシジウム プルランス M-1 (*Aureobasidium pullulans* M-1) (FERM P-19213) である、請求項 1 に記載の便秘改善剤。

【請求項 3】 固形分中に、前記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で 1~40 質量%含有し、かつ前記乳酸菌菌体を 4~95 質量%含有する、請求項 1 又は 2 に記載の便秘改善剤。

【請求項 4】 前記培養物は、固形分中に β -1, 3-1, 6-グルカンを 1 質量%以上含むものである、請求項 1~3 のいずれか一つに記載の便秘改善剤。

【請求項 5】 前記乳酸菌はエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) である、請求項 1~4 のいずれか一つに記載の便秘改善剤。

【請求項 6】 前記乳酸菌は加熱殺菌されたものである、請求項 1~5 のいずれか一つに記載の便秘改善剤。

【請求項 7】 請求項 1~6 のいずれか一つに記載の便秘改善剤を含有することを特徴とする飲食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 β -グルカン、特に β -1, 3-1, 6-グルカンを含むアウレオバシジウム属に属する菌の培養物と乳酸菌の菌体とを有効成分として含有する便秘改善剤及びそれを含有する飲食品に関する。

【0002】

【従来の技術】

アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌 (通称、黒酵母) が

産生する β -1, 3-1, 6-グルカン は、免疫増強作用、抗腫瘍活性、ガン細胞増殖抑制作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用、コレステロール低下作用、抗血栓作用、食物繊維作用、血圧降下作用、血糖降下作用、肝機能亢進等の様々な生理活性を有していることが知られており、機能性素材として利用されている。

【0003】

例えば、上記 β -1, 3-1, 6-グルカン を食品や医薬品用途、特に便秘の予防・改善のために用いた例として、下記特許文献1には、不完全菌黒色菌科アウレオバシジウム (*Aureobacidium*) 属の菌 (微工研寄託No. 4257号) が産生する多糖を主成分とする整腸剤その他の医薬が開示されている。

【0004】

また、下記特許文献2には、フラクトオリゴ糖と β -1, 3-1, 6-グルカン を主成分とする飲食品の製造方法が開示されており、この飲食品は、健康維持飲料 (腸内ビフィズス菌の増殖、便秘防止、免疫増強)、整腸剤等に利用できる旨記載されている。

【0005】

また、下記特許文献3には、 β -1, 3-1, 6-グルカン及びリンゴ抽出物を含む組成物が開示されており、この組成物が飲料や皮膚塗布剤として有用である旨、該飲料には、各種アレルギー症状の低減効果、免疫異常疾患の改善効果、がん抑制効果、血管障害疾患の改善効果、ウイルス性疾患の改善効果、泌尿器系疾患の改善効果、便秘、下痢等の消化器系疾患の改善効果が期待できる旨記載されている。

【0006】

【特許文献1】

特開昭57-149301号公報

【特許文献2】

特公平5-4063号公報

【特許文献3】

特開2002-335926号公報

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌の培養液に含まれる β -1, 3-1, 6-グルカンの濃度は低濃度 (通常、0.2% (w/v) 前後、高くても 0.5~0.6% (w/v)) であるため、上記特許文献2に記載されているように培養液をそのまま利用する場合は、比較的大量に摂取しなければ十分な生理活性が期待できないという問題があった。

【0008】

また、 β -1, 3-1, 6-グルカン濃度を高めるために、上記特許文献1に記載されているように精製を行った場合は、精製コストがかかるだけでなく、精製工程で培養液中に含まれる他の有用成分 (例えば、 β -グルカンの吸収を助ける成分であるリン、カリウム、マグネシウム、ビタミンC、オレイン酸、リノール酸等) が失われてしまうという問題があった。

【0009】

一方、上記特許文献3には、アウレオバシジウム (Aureobacidium) 属の微生物の培養液に、ビフィズス活性を補完する目的で、イソマルトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、キシリシクロース、キシロオリゴ糖、キトサン、グリコマクロペプチド、小麦ファイバー、コーンファイバー、大豆オリゴ糖、ヘミセルロース又は大豆ペプチド等を配合できることが記載されているが、上述したように培養液中の β -1, 3-1, 6-グルカン含量が低いので、上記のような成分を併用しても、十分な便秘改善効果はあまり期待できない。

【0010】

したがって、本発明の目的は、アウレオバシジウム属 (Aureobacidium sp.) に属する菌の培養液に含まれる様々な有用成分を損なうことなく利用でき、優れた便秘改善効果を有し、更には免疫賦活効果等も期待できる便秘改善剤及びそれを含有する飲食品を提供することにある。

【0011】**【課題を解決するための手段】**

上記目的を達成するため、本発明の便秘改善剤は、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカ

ンを含む培養物と、乳酸菌菌体とを有効成分として含有することを特徴とする。

【0012】

本発明の便秘改善剤は、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物をそのまま用いるので、該培養物に含まれる β -1, 3-1, 6-グルカン以外の様々な有用成分も損なうことなく利用することができる。そして、該培養物に乳酸菌菌体を配合しているので、これらの成分の相乗効果により、優れた便秘改善効果だけでなく、免疫賦活効果等も期待できる。

【0013】

本発明の便秘改善剤においては、前記アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌は、アウレオバシジウム プルランス M-1 (Aureobasidium pullulans M-1) (FERM P-19213) であることが好ましい。この態様によれば、より生理活性の高い β -1, 3-1, 6-グルカンを得ることができる。

【0014】

また、固形分中に、前記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で1~40質量%含有し、かつ前記乳酸菌菌体を4~95質量%含有することが好ましい。

【0015】

更に、前記培養物は、固形分中に β -1, 3-1, 6-グルカンを1質量%以上含むものであることが好ましい。

【0016】

更にまた、前記乳酸菌はエンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) であることが好ましい。

【0017】

これらの態様によれば、 β -1, 3-1, 6-グルカンと乳酸菌菌体による相乗的な便秘改善効果や免疫賦活効果等をより期待することができる。

【0018】

更にまた、前記乳酸菌は加熱殺菌されたものであることが好ましい。この態様によれば、加熱処理が必要な飲食品にも幅広く添加することができ、また、保存

安定性が高く、飲食品や医薬品の原料として用いる場合の安全性も非常に高い便秘改善剤を提供できる。

【0019】

本発明の飲食品は、前記便秘改善剤を含有することを特徴とする。本発明の飲食品は、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物と乳酸菌菌体とを有効成分として含有する便秘改善剤を含有するので、摂取することにより優れた便秘改善効果だけでなく、免疫賦活効果等も期待できる。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明において、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌を培養して得られる培養物（以下、単に培養物という。）としては、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属し、 β -1, 3-1, 6-グルカン生産能を有する菌を培養した培養液そのもの、該培養液の濃縮液、あるいは該培養液から水分を除いた固形物などを用いることができる。

【0021】

上記アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌としては、例えば、特開昭57-149301号公報、特公平5-4063号公報、特開2002-335926号公報等に記載された菌株を用いることができるが、本発明においては、アウレオバシジウム プルランス M-1 (*Aureobasidium pullulans* M-1、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター寄託番号FERM P-19213) が好適に用いられる。なお、本発明において、 β -1, 3-1, 6-グルカンとは、グルコースが β -1, 3結合した主鎖から β -1, 6結合でグルコースが分岐した構造を有するものを意味する。

【0022】

上記アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌の培養は、公知の方法（特開昭57-149301号公報等参照）に準じて行うことができる。すなわち、炭素源（シヨ糖）0.5～1.0質量%、N源0.1質量%、その他微量物質（例えば、ビタミン類、無機質）を加えた培地（pH 5.2～6.0）

に菌を接種し、温度 20～30℃で 2～3 日間通気培養、好ましくは通気攪拌培養すればよい。 β -1, 3-1, 6-グルカンが生成されるにしたがって培養液の粘度が上昇し、粘性の高いジェル状になる。このようにして得られる培養液には、通常、0.6～1.8 質量%の固形分が含まれており、該固形分中には β -1, 3-1, 6-グルカンが 5～80 質量%含まれている。また、 β -1, 3-1, 6-グルカン以外にも、例えば、該グルカンの吸収を助ける成分であるリン、カリウム、マグネシウム、ビタミン C、オレイン酸、リノール酸等の他の有用成分も含まれているので、 β -1, 3-1, 6-グルカンの有する生理活性効果を効率よく発揮できる。本発明においては、固形分中に β -1, 3-1, 6-グルカンを 1 質量%以上含む培養物が好ましく用いられ、固形分中に β -1, 3-1, 6-グルカンを 5 質量%以上含む培養物がより好ましく用いられる。培養物中の β -1, 3-1, 6-グルカン濃度が低すぎると、該グルカンの生理活性効果が十分に期待できない。

【0023】

なお、 β -1, 3-1, 6-グルカンの定量は、特公平 3-48201 号公報に記載された方法に準じて行うことができる。すなわち、培養終了後、培養液を殺菌して、遠心分離して菌体を除去し、得られた溶液にクロロホルム／ブタノール混合液を 10% (v/v) 加えて振とう (Sevage 法) した後、遠心処理してクロロホルムと不溶物を除去する。この操作を 2 回繰り返した後、エタノール沈殿により、沈殿物を回収して蒸留水に溶解し、酵素処理により、プルランを分解し、蒸留水中で透析を行い、透析液をエタノール沈殿して、沈殿物 (β -1, 3-1, 6-グルカン) を回収して収量を求めればよい。

【0024】

本発明においては、上記のようにして得られる培養液をそのまま加熱又は加圧加熱殺菌して用いてもよく、遠心分離等により菌体を分離除去した後殺菌して用いてもよい。また、必要に応じて濃縮したもの、更には乾燥したものをを用いることもできる。なお、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌の培養物は、増粘安定剤等の食品添加物として使用されているものであり、安全性は高い。

【0025】

また、本発明で用いられる乳酸菌としては、飲食品に使用可能な乳酸菌であれば特に制限なく用いることができるが、具体的には、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis)、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)、ラクトバチルス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus)、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei)、ストレプトコッカス・クレモリス (Streptococcus cremoris)、ストレプトコッカス・ラクティス (Streptococcus lactis)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium Longum)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (Bifidobacterium breve)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (Bifidobacterium bifidum) 等が例示できる。上記乳酸菌は単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

【0026】

なお、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis)、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) は乳酸菌製剤等に用いられている乳酸菌である。ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei)、ラクトバチルス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus) は、チーズ、発酵乳、ヨーグルト、乳酸菌飲料等に用いられている乳酸菌である。ストレプトコッカス・クレモリス (Streptococcus cremoris)、ストレプトコッカス・ラクティス (Streptococcus lactis)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus) は、チーズ、ヨーグルト等に用いられている乳酸菌である。ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium Longum)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (Bifidobacterium breve)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (Bifidobacterium bifidum) は発酵乳等に用いられている乳酸菌である。したがって、これらの乳酸菌は、いずれも当業者が容易に入手できるものである。

【0027】

本発明においては、上記の乳酸菌の中でも、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis、例えば、ATCC 19433、ATCC 14508、ATCC 123655、IFO 16803等) 及び／又はストレプトコッカス・クレモリス (Streptococcus cremori

s) が好ましく用いられ、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) が特に好ましく用いられる。エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) は、強い免疫賦活活性を有していることが知られており、上記培養物と併用することにより、これらの成分による相乗的な便秘改善効果及び免疫賦活効果が期待できる。

【0028】

本発明において、上記乳酸菌は加熱殺菌されたものであることが好ましい。これにより、加熱処理が必要な飲食品にも幅広く添加することができ、また、保存安定性が高く、飲食品や医薬品の原料として用いる場合の安全性も非常に高くなる。

【0029】

上記乳酸菌の培養は常法にしたがって行えばよく、例えば、上記乳酸菌を常法にしたがって培養して得られた培養物から、濾過、遠心分離等の方法により菌体を回収し、水洗後、水等に懸濁して80～115℃、30分～3秒間加熱処理すればよい。加熱殺菌した乳酸菌は、必要に応じて濃縮、乾燥してから用いてもよい。

【0030】

本発明の便秘改善剤は、例えば、上記アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌の培養液を殺菌したものに、上記乳酸菌の加熱殺菌菌体を混合して分散させることにより得ることができる。また、必要に応じて、錠剤、カプセル剤、粉末、顆粒、液状、ペースト状、ゼリー状等の各種形態とすることもできる。

【0031】

本発明の便秘改善剤は、固形分中に、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で1～40質量%含有し、かつ上記乳酸菌菌体を4～95質量%含有することが好ましく、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で2～40質量%含有し、かつ上記乳酸菌菌体を10～95質量%含有することがより好ましく、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で3～40質量%含有し、かつ上記乳酸菌菌体を30～95質量%含有することが特に好ましい。また、

上記基本的成分以外に、香料、甘味料、ビタミン類、ミネラル類、オリゴ糖、増粘多糖類、デキストリン等を適宜含むことができる。

【0032】

本発明の便秘改善剤の有効摂取量は、成人1日当たり、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で0.01~10g、かつ上記乳酸菌菌体を0.01~10gであり、好ましくは、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で0.5~5g、かつ上記乳酸菌菌体を0.05~1gである。

【0033】

また、本発明の便秘改善剤は、例えば、清涼飲料、ゼリー飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スープ、味噌汁等の各種飲食品に配合することもできる。上記各飲食品における本便秘改善剤の添加量は、上記の成人1日当たりの有効摂取量に基づいて設定すればよいが、通常、1~50質量%が好ましく、10~20質量%がより好ましい。なお、添加方法は、特に制限はなく、各飲食品に用いられる他の原料と一緒に最初から添加することもできる。

【0034】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。なお、以下の説明において、特に断りのない限り、「%」は「質量%」を表す。

【0035】

実施例

(1) アウレオバシジウムの培養

アウレオバシジウム プルランス M-1 (*Aureobasidium pullulans* M-1) (FERM P-19213) の前培養液を、ショ糖1%、アスコルビン酸0.2%、米糠0.2%を含む液体培地 (pH 5.3) に適量接種して、25℃、2日間、通気攪拌培養を行った。培養終了後、この培養液を121℃、15分間殺菌した。この培養液は固形分1質量%であり、該固形分中に35質量%の β -1, 3-1, 6-グルカンを含んでいた。

【0036】

(2) エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) の培養

エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis, IFO 16803) を、ロゴサ培地で 37℃、24 時間培養した前培養液を、酵母エキス 4%、ポリペプトン 3%、乳糖 10% を含む液体培地に適量接種し、pH スタットを用いて pH 6.8 ~ 7.0 に苛性ソーダ水溶液で調整しながら 37℃、22 ~ 24 時間中和培養を行った。

【0037】

培養終了後、連続遠心機で菌体を分離、回収した後、水を加えて元の液量まで希釈して再度連続遠心機で菌体を分離、回収した。この操作を合計 4 回繰り返して菌体を洗浄した。次いで、洗浄した菌体を適量の水に懸濁し、100℃、30 分間殺菌した後、スプレードライヤーを用いて菌体を乾燥して加熱殺菌菌体粉末を調製した。

【0038】

(3) 便秘改善効果の確認

上記 (1) で得られたアウレオバシジウム培養物と、上記 (2) で得られた乳酸菌菌体を用いて、以下の方法により便秘改善効果の確認試験を行った。

【0039】

試験期間は 4 週間とし、便秘体質のボランティア 10 名に、最初の 1 週間 (第 1 週目) は何も投与せず、次の 1 週間 (第 2 週目) は乳酸菌菌体 (200 mg / 日) を投与し、次の 1 週間 (第 3 週目) はアウレオバシジウム培養物 (15 ml / 日) を投与し、最後の 1 週間 (第 4 週目) はアウレオバシジウム培養物 (15 ml / 日) 及び乳酸菌菌体 (200 mg / 日) を投与した。そして、各試験サンプルの投与期間 1 週間における排便回数をチェックしてもらった。その結果を表 1 に示す。

【0040】

【表1】

	排便回数			
	第1週目	第2週目	第3週目	第4週目
被験者	投与前	乳酸菌菌体のみ	アウレオバシジウム培養物のみ	アウレオバシジウム培養物+乳酸菌菌体
1	3	3	3	5
2	2	4	2	5
3	4	4	3	6
4	3	4	3	5
5	2	2	2	3
6	2	3	3	4
7	4	5	3	7
8	2	3	3	5
9	3	3	3	6
10	3	4	3	5
平均	2.8	3.5	2.8	5.1

【0041】

表1から、乳酸菌菌体のみを投与した場合には、若干の便秘改善効果が認められるが、アウレオバシジウム培養物のみを投与した場合は、便秘改善効果がほとんど認められないことが分かる。一方、アウレオバシジウム培養物と乳酸菌菌体を併用した場合、排便回数の増加が認められ、明らかに便秘が改善されていることが分かる。

【0042】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の便秘改善剤は、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物をそのまま用いているので、該培養物に含まれる様々な有用成分を損なうことなく利用することができる。そして、該培養物に乳酸菌菌体を配合しているので、これらの成分の相乗効果によって優れた便秘改善効果だけでなく、免疫賦活効果等も期待できる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アウレオバシジウム属に属する菌の培養液に含まれる様々な有用成分を損なうことなく利用でき、優れた便秘改善効果を有し、更には免疫賦活効果等も期待できる便秘改善剤及びそれを含有する飲食品を提供する。

【解決手段】 便秘改善剤の有効成分として、アウレオバシジウム属に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物と、乳酸菌菌体とを含有させる。前記アウレオバシジウム属に属する菌は、アウレオバシジウム プルランス M-1 (FERM P-19213) であることが好ましい。また、固形分中に、前記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で1~40質量%含有し、かつ前記乳酸菌菌体を4~95質量%含有することが好ましい。更に、前記乳酸菌はエンテロコッカス・フェカリスであることが好ましい。更にまた、前記乳酸菌は加熱殺菌されたものであることが好ましい。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 6 1 3 7 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 0 0 3 5 9 7 1]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 2 月 5 日
[変更理由] 識別番号の二重登録による抹消
[統合先識別番号] 5 0 1 2 5 7 3 7 0
住 所 東京都港区白金台二丁目 7 番 7 号
氏 名 株式会社アウレオ

特願 2 0 0 3 - 0 6 1 3 7 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 2 5 7 3 7 0]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 2 月 5 日
[変更理由] 識別番号の二重登録による統合
[統合元識別番号] 5 0 0 0 3 5 9 7 1
住 所 東京都港区白金台二丁目 7 番 7 号
氏 名 株式会社アウレオ